



(51) 国際特許分類6 C12N 15/54, 9/10, 5/10	A1	(11) 国際公開番号 WO97/27303 (43) 国際公開日 1997年7月31日(31.07.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00171 (22) 国際出願日 1997年1月23日(23.01.97) (30) 優先権データ 特願平8/10365 1996年1月24日(24.01.96) JP 特願平8/161648 1996年6月21日(21.06.96) JP 特願平8/162813 1996年6月24日(24.06.96) JP 特願平8/192260 1996年7月22日(22.07.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東洋紡績株式会社 (TOYO BOSEKI KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒530 大阪府大阪市北区堂島浜二丁目2番8号 Osaka, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 谷口直之(TANIGUCHI, Naoyuki)[JP/JP] 〒560 大阪府豊中市上野東2-19-32-201 Osaka, (JP) 魚住尚史(UOZUMI, Naofumi)[JP/JP] 〒658 兵庫県神戸市東灘区森北町1-4-20-1006 Hyogo, (JP) 芝 哲夫(SHIBA, Tetsuo)[JP/JP] 〒561 大阪府豊中市服部本町1-2-28 Osaka, (JP)		柳谷周作(YANAGIDANI, Shusaku)[JP/JP] 〒520-02 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社 総合研究所内 Shiga, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: ALPHA-1-6 FUCOSYLTRANSFERASES (54) 発明の名称 α-1-6フコシルトランスフェラーゼ (57) Abstract Alpha-1-6 fucosyltransferases with a human or swine origin which have the following function; genes encoding these enzymes; expression vectors containing these genes; transformants prepared by using these expression vectors; and a process for producing a recombinant α-1-6 fucosyltransferase by incubating such a transformant. Function: transferring fucose from guanosine diphosphate to the hydroxyl group at the 6-position of GluNAc closest to R in the receptor (GlcNAcβ1-2Manα1-6)-(GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAc-R wherein R represents an asparagine residue or a peptide chain carrying this residue to thereby form (GlcNAcβ1-2Manα1-6)(GlcNAcβ1-2Manα1-3)Manβ1-4GlcNAcβ1-4(Fucα1-6)GlcNAc-R.		

(57) 要約

下記作用を有するブタ由来またはヒト由来の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼおよびこれらの酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含む発現ベクター、該発現ベクターで形質転換された形質転換体および該形質転換体を培養して、組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを製造する方法。

作用：(GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-6$)(GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-3$)Man $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-4$ GlucNAc-R
(式中、Rはアスパラギン残基または該残基を有するペプチド鎖を示す)
)を受容体として、グアノシンジホスフェート-フコースから、受容体の最もRに近いGluNAcの6位の水酸基にフコースを転移し、(GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-6$)(GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-3$)Man $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-6$)GluNAc-Rを生成する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を固定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガボロン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バハマ	GE	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GH	ガーナ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BF	ブルキナファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SS	スウェーデン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	HU	ハンガリー	VI	ヴィエトナム	TG	トーゴ
BR	ブラジル	IE	アイルランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	IS	アイスランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CC	中央アフリカ共和国	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CF	中央アフリカ共和国	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	KR	韓国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CH	スイス	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	US	米国
CI	コート・ジボワール	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CN	中国	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド	YU	ユーゴスラビア
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明細書

 α 1-6 フコシルトランスフェラーゼ

技術分野

本発明はブタまたはヒト由来の α 1-6 フコシルトランスフェラーゼに関し、特にアスパラギン型糖鎖（A s n 型糖鎖）の根幹部の A s n に結合した N-アセチルグルコサミン（G l c N A c）に、 α 1-6 結合でもって、グアノシンジホスフェート（G D P）-フコースからフコースを転移する酵素であって、糖鎖の修飾や合成などの糖鎖工学および／または癌などの疾病の診断に有用なヒト由来の新規な α 1-6 フコシルトランスフェラーゼならびに該酵素をコードする遺伝子に関する。

背景技術

近年、高等生物由来の糖蛋白質、糖脂質等の複合糖質中の糖鎖部分の構造と機能に関する関心が高まっており、その研究が盛んに行われている。糖鎖は糖加水分解酵素及び糖転移酵素の作用により形成されるが、その中でも糖転移酵素が寄与するところが多い。

糖転移酵素は糖ヌクレオチドを糖供与体として、受容体となる糖鎖に糖を転移し、糖鎖伸長を行う酵素である。その受容体糖鎖構造に対する特異性は、厳密であり、通常、1つのグリコシド結合は対応する1つの転移酵素によって形成される。それ故、糖転移酵素は複合糖質の糖鎖部分の構造糖研究、特定の糖鎖構造の簡便な合成、天然の糖鎖構造の修飾に利用されている。

また、糖鎖の人工的な改変による複合糖質あるいは細胞の性質の改変への利用が期待されている。これらのことから、基質特性の明らかな種々の糖転移酵素の開発が望まれている。

α 1-6 フコシルトランスフェラーゼは、細胞内小器官のゴルジ体に存在する酵素であり、アスパラギン結合型糖鎖のプロセッシングを制御する酵素のうちの1つであると考えられる重要な酵素である。該酵素をアスパラギン結合型糖鎖に作用させることで、その制御機構の解明、糖鎖構造形成の制御等に役立つと考えられる。

また、肝臓癌や嚢胞性線維症などのいくつかの疾病における $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ活性の上昇、及び該酵素反応生成物の割合の増加が知られており、該酵素活性を測定することによる、あるいは $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを用いたノーザンブロット法による、又は生体中に転写発現されたmRNA量をRT-PCR法で定量することによる、これらの疾病の診断法の早急なる開発が望まれている。

$\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは、各種動物の体液あるいは臓器中、各種動物の培養細胞にその活性は検出されているものの、精製された酵素標品としては、ヒト嚢胞性線維症細胞破砕物 [ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、第 266 巻、第 21572 ~ 21577 頁 (1991)] 由来の酵素が知られているが、この報告では、1) 至適 pH が 5.6 であって、生理学的 pH とは異なる、2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分子量が 34,000 および 39,000 と比較的低分子量である、3) ヒト細胞由来のために大量および安定供給が事実上、困難であるなどの欠点を有していた。

また、この酵素は膜結合型酵素として得られ、さらに細胞の培養に牛血清を必要とすることから、酵素の精製が困難なうえ、出発材料となる細胞を培養するのに莫大な費用がかかる。したがって、該酵素標品を安定して供給することは事実上困難である。

また、糖鎖の合成法としては、化学合成法も時として採用されているが、その複雑な合成経路および反応の特異性から、少糖類の合成は、多くの合成ステップが必要であり、実用上、問題が多い。さらに、フコースを $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で、アスパラギン型糖鎖の Asn に結合した GlcNAc に結合させる反応は、フコースの安定性の問題で非常に困難である。

発明の開示

本発明の目的は、糖鎖構造解析用または糖鎖工学用試薬、あるいは診断薬として有用な $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを大量に、かつ安定して提供することにある。

また、本発明の別な目的はヒトまたはブタ由来 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を用いて、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを大量に生産する方法を提供するものである。また、これらの遺伝子を特定することにより、該酵素をコードするDNAを用いたノーザンブロット法、又は生体中に転写発現されたmRNA量をRT-PCR法で定量する方法により、疾病の診断法の開発を可能とするものである。

上記目的を達成するために、本発明者らは、該酵素の受容体であるアスパラギン型糖鎖に類似した蛍光標識された基質を用いることにより、フコースを $\alpha 1-6$ 結合でもって、アスパラギン型糖鎖のAsnに結合したGlcNAcに結合させる酵素の検討に着手し、その結果、精製出発材料として入手が容易なブタ脳の抽出画分に、該酵素活性を検出し、該画分から該酵素を精製し、その酵素学的および理化学的性質を解明し、本発明に到達した。

すなわち、本発明は下記理化学的性質を有するブタ由来 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ（以下、ブタ $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼと呼ぶ）である。

（１）作用：

$(GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-6)(GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-3)Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4GluNAc-R$
 （式中、Rはアスパラギン残基または該残基を有するペプチド鎖を示す）を受容体として、グアノシンジホスフェート-フコースから、受容体の最もRに近いGluNAcの6位の水酸基にフコースを転移し、 $(GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-6)(GlcNAc\beta 1-2Man\alpha 1-3)Man\beta 1-4GlcNAc\beta 1-4(Fuca 1-6)GluNAc-R$ を生成する。

上記式において、Rを示すアスパラギン残基とは、アスパラギンの側鎖の酸アミド基が糖鎖の還元末端のアノマー位の水酸基と結合した残基をいう。また、該残基を有するペプチド鎖とは、2個以上のアミノ酸が結合したペプチド中に、該残基を有するペプチド鎖をいい、好ましくは、 $-Asn-(X)-Ser/Th$

r-を有するペプチド鎖である。

(2) 至適pH: 約7.0

(3) pH安定性: 4℃、5時間の処理で、pH4.0～10.0の範囲で安定である。

(4) 至適温度: 約30～37℃

(5) 阻害または活性化: 活性の発現に、2価金属イオンを要求せず、また、5mM EDTA存在下においても活性は阻害されない。

(6) 分子量: 約60,000 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

また、本発明者らは、ブタ脳より α 1-6フコシルトランスフェラーゼを単一に精製し、このタンパク質のアミノ酸分析を行い、その部分アミノ酸配列をもとに遺伝子のクローニングを行い、本発明に到達した。

すなわち、本発明はブタ α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

また、本発明はブタ α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクターである。

さらに、本発明はブタ α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクターにより宿主細胞を形質転換した形質転換細胞である。

また、本発明は、ブタ α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクターにより宿主細胞を形質転換した形質転換細胞を培養し、該培養物から α 1-6フコシルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする組換え α 1-6フコシルトランスフェラーゼの製造方法である。

さらに、本発明者らは、ヒト細胞培養液から α 1-6フコシルトランスフェラーゼ活性を有するタンパク質を精製し、酵素学的性質を解明して、本発明に到達した。

すなわち、本発明は下記理化学的性質を有するヒト由来 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ（以下、ヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼと呼ぶ）であ

る。

(1) 作用：

(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-R
(式中、Rはアスパラギン残基または該残基を有するペプチド鎖を示す)
)を受容体として、グアノシンジホスフェート-フコースから、受容体の最もRに近いGlcNAcの6位の水酸基にフコースを転移し、(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc-Rを生成する。

上記式において、Rを示すアスパラギン残基とは、アスパラギンの側鎖の酸アミド基が糖鎖の還元末端水酸基と結合した残基をいう。また、該残基を有するペプチド鎖とは、2個以上のアミノ酸が結合したペプチド中に、該残基を有するペプチド鎖をいい、好ましくは、-Asn-(X)-Ser/Thr-を有するペプチド鎖である。

(2) 至適pH：約7.5

(3) pH安定性：4℃、5時間の処理で、pH4.0～10.0の範囲で安定である。

(4) 至適温度：約30～37℃

(5) 阻害または活性化：活性の発現に、2価金属を要求せず、また、5mMEDTA存在下においても活性は阻害されない。

(6) 分子量：約60,000 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

さらに、本発明者らは、ヒト培養細胞より α 1-6フコシルトランスフェラーゼを単一に精製し、このタンパク質のアミノ酸分析を行い、その部分アミノ酸配列をもとに遺伝子のクローニングを行い、本発明に到達した。

すなわち、本発明はヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

また、本発明はヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子

を含んでなる発現ベクターである。

さらに、本発明はヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクターにより宿主細胞を形質転換した形質転換細胞である。

本発明は、ヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクターにより宿主細胞を形質転換した形質転換細胞を培養し、該培養物から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの製造方法である。

本発明の酵素の精製出発材料としては、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ活性を有するブタの臓器または体液がある。臓器の具体例としては、例えば、脳、精巣、脾臓、肺、腎臓等が挙げられる。また、血液や血清などのブタ体液を用いることもできる。

本発明のブタ $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは、例えばブタ脳の破砕物から粗酵素抽出物を調製し、次に、この粗酵素抽出物から分離する。この場合、ブタ脳中の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは、膜結合型酵素であるので、脳破砕物より適当な界面活性剤を用いて粗酵素抽出液を得ることが通常、採用される。さらに、この粗酵素抽出液から公知の精製手段を組み合わせ、精製酵素標品を得ることができる。例えば、限外ろ過膜による濃縮や脱塩、基質類似体を固定化したアフィニティーカラムクロマトグラフィー、イオン交換カラムクロマトグラフィー、疎水結合カラムクロマトグラフィーなどの組み合わせにより精製を行い、他のトランスフェラーゼ等の夾雑タンパクのない、実質的に単一の酵素標品を得ることができる。例えば、ブタ脳をリン酸緩衝液中でワーリングブレンダーを用いて破碎、超遠心分離により膜画分を集めた後、この膜画分より界面活性剤、トリトン (Triton) X-100 を含むリン酸緩衝液で目的酵素を抽出し、さらに超遠心分離によって上清を集めて、粗酵素抽出液を得ることができる。グアニンジホスフェート (GDP) -ヘキサノールアミン-セファロース、GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-6$ (GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-3$) Man $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-4$ GlcNAc-アスパラギン-セファロース等

本発明の一実施態様であるブタ脳由来の α 1-6フコシルトランスフェラーゼの理化学的性質を下記に示す。

(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-R
(式中、Rはアスパラギン残基または該残基を有するペプチド鎖を示す)
を受容体として、グアノシンジホスフェート-フコースから、受容体の最もRに近いGluNAcの6位の水酸基にフコースを転移し、(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc-Rを生成する。

本発明のブタ α 1-6フコシルトランスフェラーゼ活性の測定は、次のようにして行った。すなわち、糖鎖末端のアスパラギンを4-(2-ピリジルアミノ)ブチルアミン〔PABA: $-\text{NH}_2$ (CH₂)₄ $-\text{NH}-\text{pyridine}$ 〕で蛍光標識してある下記式で示される化合物を酵素活性の測定基質として用いた。該基質を用いることにより、フコースが α 1 \rightarrow 6結合で転移した酵素反応の生成物の高速液体クロマトグラフィーによる蛍光検出が可能となる。

[illegible]

具体的な測定方法を以下に述べる。上記式で示される受容体である蛍光標識基質 62.5 μ M および供与体である基質 (GDP-フコース) 625 μ M を含む 250 mM メス (MES) 緩衝液、pH 7.0、40 μ l に、試料液 10 μ l および 1.25% トリトン X-100 を添加し混合する。37℃ で 1 時間反応させ

た後、5分間の煮沸により反応を停止させ、反応液を高速液体クロマトグラフィーに供し、生成物のピークを蛍光検出器で定量する。酵素量1単位は、この条件下で、1分間に1 pmoleのGlcNAc β 1-2Man α 1-6 (GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4 (Fuc α 1-6)GlcNAc-R [RはAsn-NH-(CH₂)₄-NH-Pyridine)を生じるものとした。

(3) 至適pH

本発明のブタ脳由来の α 1-6フコシルトランスフェラーゼ(ブタ脳 α -6フコシルトランスフェラーゼと呼ぶ)は、pH7.0~7.5付近に高い活性を示す。

(4) pH安定性

本発明のブタ脳 α 1-6フコシルトランスフェラーゼは、pH4~10で比較的安定であり、特にpH5~9の間においてより良好な安定性を示す。

(5) 至適温度

本発明のブタ脳 α 1-6フコシルトランスフェラーゼは、至適温度が37℃付近に認められ、また、20~40℃の範囲で十分な作用を保持する。

(6) 2価金属イオン要求性

本発明のブタ脳 α 1-6フコシルトランスフェラーゼは、マグネシウム、マンガンの2価金属イオンの非存在下でも十分な活性を示す。さらに、キレート剤である5mM EDTAの存在下でも十分な活性を示す。

(7) 分子量

本発明のブタ脳 α 1-6フコシルトランスフェラーゼの精製標品は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60,000のところに単一バンドを示す。

以上の性質より判断して、本発明のブタ脳 α 1-6フコシルトランスフェラーゼは、至適pH、金属イオン要求性、分子量の点で、従来のヒト囊胞性線維症細胞由来の α 1-6フコシルトランスフェラーゼ(至適pH5.6、分子量34,000および39,000)とは明らかに相違する新規な酵素である。

本発明のブタ α 1-6フコシルトランスフェラーゼの期待される用途としては

1) 糖鎖化合物の合成: 1-6 フコースを含む糖鎖化合物を本発明の酵素で合成する、2) 糖鎖構造の改変と機能解析: アスパラギン型糖鎖に新たにフコースを導入し、糖鎖構造を人工的に改変することができ、細胞機能変化や複合糖質のプロセッシング制御機構の解明および糖鎖の役割を解明することができる、3) 酵素活性による病変の診断: 本酵素活性は腫瘍化に伴う種々の病変を反映しており、酵素活性を測定することにより癌などの疾病の診断を行うことができる、4) 本発明の酵素に対する特異的抗体を作製し、該抗体を用いることにより、種々の疾病の診断を行うことができる、などの極めて有用な用途がある。

本発明はブタ α 1-6 フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であり、その一実施態様は配列表・配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む α 1-6 フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。また、別な態様は配列表・配列番号 1 に示される塩基配列を含む α 1-6 フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

本発明の一実施態様は配列表・配列番号 2 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸が、置換、挿入、削除、又は付加されているアミノ酸配列をコードする遺伝子を含むブタ α 1-6 フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

また、本発明の別の実施態様は、配列表・配列番号 1 に示される塩基配列の少なくとも 1 つが置換、挿入、削除、又は付加されている塩基配列を含むブタ α 1-6 フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

さらに、本発明の実施態様は、配列表・配列番号 1 に示される塩基配列を含むブタ α 1-6 フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の少なくとも一部にハイブリダイズする遺伝子である。

本発明の発現ベクターは上記したブタ α 1-6 フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクターである。

また、本発明の形質転換細胞は、上記した発現ベクターにより宿主細胞を形質転換したものである。

宿主細胞としては、微生物、例えば大腸菌、酵母、細菌などの細胞が挙げられ

る。動物細胞、例えば昆虫細胞、COS-1、CHO細胞などが挙げられる。また、植物細胞、例えばタバコ植物細胞、アラビドプシス細胞などが挙げられる。

ベクターとしては、形質転換する宿主に応じて、様々なものを使用できる。

例えば大腸菌では、pUC19など、酵母では、pYEUra3TMなど、昆虫細胞では、pBLUE Bac4など、COS-1細胞では、pSVK3など、タバコ植物細胞、アラビドプシス細胞では、pBIなどが挙げられる。

さらに、本発明の組換え α 1-6フコシルトランスフェラーゼの製造方法は上記した形質転換細胞を培養し、該培養物から α 1-6フコシルトランスフェラーゼを採取する方法である。

本発明では、例えばブタ脳より α 1-6フコシルトランスフェラーゼを単一に精製し、このタンパク質のアミノ酸分析を行い、その部分アミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列より、PCR用のプライマーを調製する。このプライマーを用い、ブタ脳由来のcDNAを鋳型としてPCRをおこない、 α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を増幅して、プローブを作成する。続いて、該プローブを用いてブタ脳由来のcDNAライブラリー中より α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含有するクローン体を検索し、 α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを単離し、次いで該cDNAを用いた α 1-6フコシルトランスフェラーゼの発現を行う。

具体的には、精製されたブタ α 1-6フコシルトランスフェラーゼを用いて、アミノ酸配列の解析を行う。例えばSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エレクトロブロットング法によりPVDF膜に転写した後、約60kDaのバンドを含有するPVDF膜を切り出し、プロテインシーケンサーにより配列決定を行う。配列表・配列番号3で示される α 1-6フコシルトランスフェラーゼのアミノ末端のアミノ酸配列を得る。

また、精製 α 1-6フコシルトランスフェラーゼをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、電気泳動により分離されたペプチド断片をエレクトロブロットング法によりPVDF膜に転写した後、60kDaのバンドを含有するPVDF膜を切り出し、該PVDF膜切片上でプロテアーゼ、例えばリジルエン

ドペプチダーゼを用い分解を行った後、該PVDF膜切片より分解物を抽出し、該抽出液を逆相高速液体クロマトグラフィーにより分離することにより分解物を得る。

次に、これらのアミノ酸配列より、PCR用のミックスプライマーを作成する。例えば、配列番号3のアミノ酸配列より、配列番号7で示される塩基配列を有するミックスプライマー、配列番号4のアミノ酸配列より、配列番号8で表されるミックスプライマーをそれぞれDNA合成機で合成し、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼcDNAの検索に使用する。

例えば、ブタ脳由来のcDNAを鋳型とし、配列番号7のミックスプライマーと配列番号8のミックスプライマーを使用し、94℃（1分間）、55℃（2分間）、72℃（3分間）を1サイクルとして、PCRを25サイクル行うことにより、約1.45kbpのDNA断片を増幅する。

増幅された該DNA断片をプローブとして用い、ブランクハイブリダイゼーション法により、ブタ脳由来のcDNAライブラリー中より $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含有するクローン体を検索する。これらのクローン体から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAの単離を行うことができる。得られた該cDNAの塩基配列および該塩基配列から推測されるアミノ酸配列を配列番号1および2に示す。

また、該cDNAは発現ベクター、例えばpSVK3にサブクローニングされる。サブクローニングされた該プラスミドにより形質転換された宿主細胞、例えばCOS-1細胞を培養し、該培養物から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを得ることができる。

本発明では、上記した形質転換細胞を培養し、該培養物から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを採取することにより、組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを製造する。培養物から該酵素を採取する方法は、通常の方法に従う。

本発明のブタ $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子およびその分解物であるDNA断片は、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの生体中での発現過程の測定に使用することもでき、肝臓癌や嚢胞性線維症などのいくつかの疾病の遺伝子診断においても有用である。

また、これらの遺伝子がコードするポリペプチドを用いて、種々の抗体を免疫学的に作成することもでき、これらの抗体も診断用途や、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの精製などにも有用である。

また、本発明の酵素の精製出発材料としては、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ活性を有するヒト細胞培養液であれば、いかなるものでもよい。 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ活性を有する細胞の具体例としては、例えばヒト脾臓癌細胞、ヒト胃癌細胞、ヒト骨髄腫細胞等が挙げられる。

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは膜結合型酵素として細胞膜に存在するが、タンパク質分解酵素によって酵素活性に影響のない部位で切断されることにより、可溶型酵素として培養液中に放出されるので、細胞の破碎、酵素の可溶化などの煩雑な操作なしに培養液を粗酵素液として用いることができる。また、無血清培養可能な細胞を用いることで、高純度の粗酵素液を安価に得ることができる。培養液を濃縮、脱塩した後、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーなどにより夾雑する他のトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼ活性のない精製酵素標品を得ることができる。

ヒト胃癌細胞より $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを精製する方法としては、例えばヒト胃癌細胞MKN 45を無血清培養し、得られた培養液から該酵素を精製する。この場合、ヒト胃癌細胞MKN 45の $\alpha-1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼは、細胞の蛋白質分解酵素によって酵素活性に影響のない部分で切断され、可溶型 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼとして培養液中に放出されるために、細胞の破碎、界面活性剤による酵素の可溶化などの操作なしに、細胞培養液をそのまま粗酵素溶液として使用することができる。さらに、この粗酵素溶液から公知の精製手段を組み合わせ、精製酵素標品を得ることができる。

本発明では、例えばヒト胃癌細胞MKN 45の無血清培養液を限外濾過膜で濾過濃縮、5 mM 2-メルカプトエタノールおよび0.1% CHAPS (3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルフォネート)を含むトリス-塩酸緩衝液、pH 7.5で緩衝液交換を行い、粗酵素液をすることができる。

さらに、この酵素液をQ-セファロース、GDP-ヘキサノールアミン-セファロース、 $(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6)(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ -アスパラギン-セファロース等のカラムクロマトグラフィーに供し、活性画分を集めて、本発明のフコシルトランスフェラーゼを精製することができる。

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの酵素化学的性質は、次のとおりである。

(1) 作用：

$(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6)(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}-\text{R}$
(式中、Rはアスパラギン残基または該残基を有するペプチド鎖を示す)
を受容体として、グアノシンジホスフェート-フコースから、受容体の最もRに近いGlcNAcの6位の水酸基にフコースを転移し、 $(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6)(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-6)\text{GlcNAc}-\text{R}$ を生成する。

(2) 酵素活性の測定

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ活性の測定は、次のようにして行った。すなわち、糖鎖末端のアスパラギンを4-(2-ピリジルアミノ)ブチルアミン〔PABA: $-\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{pyridine}$ 〕で蛍光標識した前記式で示される化合物を酵素活性の測定基質として用いた。該基質を用いることにより、フコースの $\alpha 1-6$ 結合で転移した酵素反応の生成物の高速液体クロマトグラフィーによる蛍光検出が可能となる。

具体的な測定方法を以下に述べる。上記式で示される受容体である蛍光標識基質 $6.2.5\mu\text{M}$ および供与体である基質(GDP-フコース) $62.5\mu\text{M}$ を含む 250mM メス(MES)緩衝液、 $\text{pH}7.0$ 、 $40\mu\text{l}$ に、酵素液 $10\mu\text{l}$ を加えて混合し、 37°C で1時間反応させた。5分間の煮沸により反応を停止させた後、反応液を高速液体クロマトグラフィーに供し、生成物のピークを蛍光検出器で定量する。

酵素量1単位は、この条件下で、1分間に1 pmoleの $\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1\rightarrow 4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-6)\text{GlcNAc}-\text{R}$ (Rは $\text{Asn}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{Pyridine}$)を生じるものとした。

(3) 至適pH

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの至適pHは、図1の曲線で表されるごとく、pH約7.0～7.5付近に高い活性を有している。図1において、pH4.5～7.5は500mMメス(MES)緩衝液(黒丸)を、pH7.0～9.0は100mMトリス-塩酸緩衝液(白丸)を用いて測定を行った。

(4) pH安定性

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのpH安定性は、図2に示すように、pH約4～10であり、特にpH5～9の間において安定である。測定に用いた緩衝液はpH3.5～5.5は50mM酢酸緩衝液(黒三角)を、pH5.5～7.5は50mMメス(MES)緩衝液(黒丸)を、pH7.5～9.0は50mMトリス-塩酸緩衝液(白丸)を、pH9.0～11.5は炭酸水素ナトリウム緩衝液(白三角)を用いた。本発明の酵素を各緩衝液中で、それぞれのpHにおいて、4℃、5時間処理した後の残存活性の測定を行った。なお、図1は本発明により得られるヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのpH(横軸)と相対活性(%、縦軸)の関係を示すグラフ、図2はpH(横軸)と残存活性(%、縦軸)との活性を示すグラフである。

(5) 至適温度

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの至適温度は、図3に示すように、約37℃付近であり、また、20～40℃の範囲で使用可能である。凍結品は-20℃で少なくとも数カ月安定である。

(6) 2価金属イオン要求性

多くの糖転移酵素はその活性にマグネシウム、マンガンなどの2価金属を必要とするが、本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは2価金属非存在下あるいはキレート剤であるEDTA存在下で十分な活性を示し、2価金属イオ

ン要求性を示さない。

(7) 分子量

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの精製標品は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、分子量約60,000のところに単一バンドを示す。

(8) 形態

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは、本来、膜結合型酵素として細胞膜に存在するが、これまでに報告がなされているブタ由来の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼおよびヒト嚢胞性繊維症細胞の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼとは異なり、培養細胞中のタンパク質分解酵素によって酵素活性に影響のない部位で切断されることにより培養液中に放出されるため、取扱いの容易な可溶型酵素として存在する。

上記性質から見て、本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは、至適pH、金属要求性、分子量の点で、従来のヒト嚢胞性繊維症細胞由来の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ（至適pH6.5、分子量34,000および39,000）とは明らかに相違する新規な酵素である。

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを利用して、下記事項を説明することができる。

(1) アスパラギン結合型糖鎖に新たにフコースを導入し、糖鎖構造を人工的に改変することができる。そのことによって、細胞装置や複合糖質の糖鎖のプロセッシング制御機構の解明及び糖鎖の役割を説明することができる。

(2) 本発明の酵素活性を測定することにより、種々の疾病の診断を行うことができる。

(3) 本発明の酵素に対する特異抗体を作製し、該抗体を用いることにより、種々の疾病の診断を行うことができる。

本発明はヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であり、その一実施態様は配列表・配列番号10に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

また、別な態様は配列表・配列番号 9 に示される塩基配列を含む $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。さらに、別な態様は配列表・配列番号 9 に示される 198 番目のアデニンから 1919 番目のグアニンまでに示される塩基配列を含む $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

本発明の一実施態様は配列表・配列番号 10 に示されるアミノ酸配列の少なくとも 1 つのアミノ酸が、置換、挿入、削除、又は付加されているアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

また、本発明の別の実施態様は、配列表・配列番号 9 に示される塩基配列の少なくとも 1 つが置換、挿入、削除、又は付加されている塩基配列を含む $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である。

さらに、本発明の実施態様は、配列表・配列番号 9 に示される塩基配列を含む $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の少なくとも一部にハイブリダイズする遺伝子である。

本発明の発現ベクターは上記した $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクターである。

また、本発明の形質転換細胞は、上記した発現ベクターにより宿主細胞を形質転換したものである。

宿主細胞としては、微生物、例えば大腸菌、酵母、細菌などの細胞が挙げられる。動物細胞、例えば昆虫細胞、COS-1、CHO細胞などが挙げられる。また、植物細胞、例えばタバコ植物細胞、アラビドプシス細胞などが挙げられる。

ベクターとしては、形質転換する宿主に応じて、様々なものを使用できる。例えば、大腸菌では、pUC19 など、酵母では、pYEUra3TM など、昆虫細胞では、pBLUE Bac4 など、COS-1 細胞では、pSVK3 など、タバコ植物細胞、アラビドプシス細胞では、pBI などが挙げられる。

さらに、本発明の組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの製造方法は上記した形質転換細胞を培養し、該培養物から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを採取する方法である。

本発明では、例えばヒト胃癌細胞より $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを単一に精製し、このタンパク質のアミノ酸分析を行い、その部分アミノ酸配列を決定し、そのアミノ酸配列より、PCR用のプライマーを調製する。このプライマーを用い、ヒト胃癌細胞由来のcDNAを鋳型としてPCRをおこない、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を増幅して、プローブを作成する。続いて、該プローブを用いてヒト胃癌細胞由来のcDNAライブラリー中より $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含有するクローン体を検索し、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを単離し、次いで、該cDNAを用いて $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの発現を行う。

具体的には、精製された $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを用いて、アミノ酸配列の解析を行う。例えばSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、エレクトロブロッティング法によりPVDF膜に転写した後、約60kDaのバンドを含有するPVDF膜を切り出し、プロテインシーケンサーにより配列決定を行う。配列表・配列番号11で示される $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのアミノ末端のアミノ酸配列を得る。

また、精製 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをプロテアーゼ、例えばリジルエンドペプチダーゼと共にSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、電気泳動により分離されたペプチド断片をエレクトロブロッティング法によりPVDF膜に転写した後ペプチド断片を含むバンドを切り出し、プロテインシーケンサーにより配列決定を行う。配列表・配列番号12及び13で示される $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの部分アミノ酸配列を得る。次に、これらのアミノ酸配列より、PCR用のミックスプライマーを作成する。例えば、配列番号12のアミノ酸配列より、配列番号14で示される塩基配列を有するミックスプライマー、配列番号13のアミノ酸配列より、配列番号15で示される塩基配列を有するミックスプライマーをそれぞれDNA合成機で合成し、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼcDNAの検索に使用する。

例えば、ヒト胃癌細胞由来のcDNAを鋳型とし、配列番号14のミックスプライマーと配列番号15のミックスプライマーを使用し、94℃（30秒間）、

46℃（30秒間）、72℃（1分30秒間）を1サイクルとして36サイクル行うことにより、約200bpのDNA断片を増幅する。

増幅された該DNA断片をプローブとして用い、ブランクハイブリダイゼーション法により、ヒト胃癌細胞由来のcDNAライブラリー中より $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含有するクローン体を検索する。これらのクローン体から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAの単離を行うことができる。得られた該cDNAの塩基配列および該塩基配列から推測されるアミノ酸配列を配列番号9および10に示す。

また、該cDNAは発現ベクター、例えばpSVK3にサブクローニングされる。サブクローニングされた該プラスミドにより形質転換された宿主細胞、例えばCOS-1細胞を培養し、該培養物から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを得ることができる。

本発明では、上記した形質転換細胞を培養し、該培養物から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを採取することにより、組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを製造する。

培養物から該酵素を採取する方法は、通常の方法に従う。

本発明のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子およびその分解物であるDNA断片は、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの生体中での発現過程の測定に使用することもでき、肝臓癌や嚢胞性線維症などのいくつかの疾病の遺伝子診断においても有用である。

また、これらの遺伝子がコードするポリペプチドを用いて、種々の抗体を免疫学的に作成することもでき、これらの抗体も診断用途や、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの精製などに有用である。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの至適pHを示す図である。

図2は、本発明のブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのpH安定性を示す図である。

図3は、本発明のブタ脳 α 1-6フコシルトランスフェラーゼの至適温度を示す図である。

図4は、本発明のヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼの至適pHを示す図である。

図5は、本発明のヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼのpH安定性を示す図である。

図6は、本発明のヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼの至適温度を示す図である。

実施態様例

以下に、実施例を用いて本発明を具体的に説明する。

本発明では、酵素活性を下記のようにして測定する。

糖鎖末端のアスパラギンを4-(2-ピリジルアミノ)ブチルアミン〔PABA: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{ピリジン}$ 〕で蛍光標識してある下記式で示される化合物を酵素活性の測定基質として用いた。該基質を用いることにより、フコースが $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合で転移した酵素反応の生成物の高速液体クロマトグラフィーによる蛍光検出が可能となる。

式

具体的な測定方法は、上記式で示される受容体である蛍光標識基質 $62.5 \mu\text{M}$ および供与体である基質 (GDP-フコース) $625 \mu\text{M}$ を含む 250 mM メス (MES) 緩衝液、 $\text{pH} 7.0$ 、 $40 \mu\text{l}$ に、試料液 $10 \mu\text{l}$ および 1.25% トリトン X-100 を添加混合する。 37°C で1時間反応させた後、5分間の煮沸により反応を停止させ、反応液を高速液体クロマトグラフィーに供し、生成物のピークを蛍光検出器で定量する。酵素量1単位は、この条件下で、1分間に 1 pmol の $\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6(\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4(\text{Fuc}\alpha 1-6)\text{GlcNAc}-\text{R}$ (Rは $\text{Asn}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{Pyridine}$) を生じるものとした。

実施例 1(1) ブタ脳の破碎物と粗抽出液の調製

ブタ脳 100 g を 20 mM リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH} 7.0$) 中でワーリングブレンダーを用いて破碎した後、超遠心分離により膜画分を集めた。この膜画分を、濃度 0.5% のトリトン X-100 を含む同緩衝液を用いて、酵素の抽出を行った。抽出操作後、遠心分離によって上清を集め、粗酵素抽出液とした。

(2) 粗抽出液からの酵素の精製

0.05% トリトン X-100、 50 mM KCl を含む 20 mM リン酸

カリウム緩衝液 (pH 7.0) で、 $\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-6$ ($\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1-3$) $\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ -アスパラギン-セファロースのカラム (トランスフェリン由来のアシアロアガラクト糖ペプチドカラム) を平衡化し、上記 (1) で調製した粗酵素抽出液を供した。非吸着画分に蛋白質が検出されなくなるまでカラムを同緩衝液で洗浄した後、活性画分を、1 M KCl を含む同緩衝液で溶出させた。次に、酵素の活性画分を限外濾過膜により濃縮、脱塩を行った後、同緩衝液で平衡化した GDP-ヘキサノールアミン-セファロースのカラムに供した。溶出は 100 mM

GDP を含む同緩衝液により行った。活性画分を集めて限外ろ過膜で濃縮、脱塩を行うことにより、ブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを得ることができた。このようにして得られたブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、分子量約 60,000 の位置に単一バンドを示し、不純物に起因する他のバンドはみられず、また、他のトランスフェラーゼ活性もなく、高純度の酵素標品であった。

本発明の酵素の至適 pH (緩衝液の pH を変化させて求めた結果) を図 1 に示す。該酵素は、pH 7.0 ~ 7.5 付近に高い活性を示した。なお、緩衝液は、200 mM メス (MES) 緩衝液 (黒丸) を使用した。グラフの横軸は本発明により得られる $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの pH、縦軸は相対活性 (%) を表す。

本発明の酵素の pH 安定性についても、同様に検討した。図 2 は、該酵素を各緩衝液中でそれぞれの pH において、4℃、5 時間処理した後の残存活性を示しているが、該酵素は pH 4 ~ 10 で比較的安定であり、特に pH 5 ~ 9 の間においてより良好な安定性を示した。緩衝液は、pH 3.5 ~ 5.5 は 50 mM 酢酸緩衝液 (黒三角) を、pH 5.5 ~ 7.5 は 50 mM メス (MES) 緩衝液 (黒丸) を、pH 7.5 ~ 9.0 は 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (白丸) を、pH 9.0 ~ 11.5 は炭酸水素ナトリウム緩衝液 (白三角) を、それぞれ用いた。グラフの横軸は本発明により得られる $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの pH、縦軸は残存活性 (%) を表す。

本発明の酵素の至適温度は、図 3 に示すように 37℃ 付近に認められ、また、

20～40℃の範囲で十分な作用を保持すると考えられた。また、凍結品は-20℃で少なくとも数カ月間は安定にその活性を保持した。緩衝液は、200 mM メス (MES) 緩衝液、pH 7.0 (黒丸) を使用した。グラフの横軸は、処理温度 (℃)、縦軸は、本発明により得られる $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの相対活性 (%) を表す。

多くの糖転移酵素はその活性の発現にマグネシウム、マンガンなどの2価金属イオンを必要とするが、本発明の酵素はこれらの2価金属イオン非存在下でも十分な活性を示した。さらに、キレート剤である5 mM EDTAの存在下でも十分な活性を示したことから、2価金属イオンの要求性は示さないと結論した。

実施例 2

ブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのアミノ末端アミノ酸配列の決定

5 μ g の精製したブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、エレクトロブロットティング法により PVDF 膜 (ミリポア社製) に蛋白質を転写した。該 PVDF 膜をクーマシーブリリアントブルー G 250 により染色し、60 kDa の位置に単一のブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのバンドを検出した。

次に該バンドを含む PVDF 膜を切り取り、50%メタノールで脱染色した後、バイオシステム 473A プロテインシーケンサー (アプライドバイオシステム社製) に供し、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのアミノ末端アミノ酸配列を決定した。決定されたアミノ酸配列を配列表・配列番号 3 に示す。

実施例 3

ブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの部分アミノ酸配列の決定

13 μ g の精製したブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、エレクトロブロットティング法により PVDF 膜 (ミリポア社製) に蛋白質を転写した。該 PVDF 膜をクーマシーブリリアントブルー G 250 により染色し、60 kDa の位置に単一のブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのバンドを検出した。

次に、該バンドを含む PVDF 膜を切り取り、50%メタノールで脱染色した

後、該PVDF膜切片を1 μ gのリジルエンドペプチダーゼを含む100mMトリス塩酸緩衝液-5%アセトニトリル(pH 8.2)中、37°Cで12時間処理し、タンパク分解を行った。分解処理を行った該PVDF膜切片を超音波処理することにより分解物の抽出を行った。得られた該分解物をC-18カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーによって分離し、3つのペプチド断片を得た。該ペプチド断片を含む逆相高速液体クロマトグラフィー分離物をポリブレンコートしたトリフルオロ酢酸活性化プレサイクルドグラスファイバーフィルターに供して乾燥させた後に、バイオシステム473Aプロテインシーケンサー(アプライドバイオシステム社製)に供し、ブタ脳 α 1-6フコシルトランスフェラーゼの部分アミノ酸配列を決定した。決定されたアミノ酸配列を配列表・配列番号4~6に示す。

実施例 4

PCRによるプローブDNAの作成

実施例2および3で得られたアミノ酸配列をもとにして、配列表・配列番号7および8に示されるミックスプライマーを合成した。配列表・配列番号7で示されるミックスプライマーはセンスプライマーとして、配列表・配列番号8で表されるミックスプライマーはアンチセンスプライマーとしてPCR反応に使用した。PCR反応は2 μ gブタ脳由来のcDNA、25 pmol eセンスプライマー(配列番号7で示されるミックスプライマー)、25 pmol eアンチセンスプライマー(配列番号8で示されるミックスプライマー)、および2.5単位Taq DNAポリメラーゼを含む50mM塩化カリウム-10mMトリス・塩酸緩衝液(pH 8.3)-1.5mM塩化マグネシウム-0.001%ゼラチン-200 μ M dNTP反応溶液50 μ l中、94°C(1分間)、55°C(2分間)、72°C(3分間)を1サイクルとしてPCRを25サイクル行った。

PCR反応後の反応液10 μ lを、0.7%アガロースゲル電気泳動に供することにより、PCR反応産物であるDNA断片の確認を行った。配列番号7で表されるミックスプライマーと配列番号8で表されるミックスプライマーの組み合わせで行ったPCR反応の結果、アガロースゲル電気泳動において1.45 kbの大きさのDNA断片が確認された。

該DNA断片をプラスミドpT7BLUE t-V e c t o r (ノバジェン社製) にサブクローニングし、塩基配列の確認を行った結果、配列表の配列番号3～6に記載のアミノ酸配列に相当するDNAが検出され、該DNA断片が $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の一部分であることが確認された。

実施例 5

ブタ脳 $\alpha-1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

実施例4で得られたDNA断片を $\alpha-^{32}\text{P dCTP}$ (3000Ci/mmo l、アマシャム社製) でラベルしたものをプローブとして用い、ブタ脳由来の λ g t 11 cDNAライブラリー (クロンテック社製) からブランクハイブリダイゼーション法により、 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含有するクローン体の検索を行った。

約40万個のブランクを検索した結果、5個の陽性クローン体c1、c2、c3、c4、及びc5が得られた。該クローン体c1及びc2はその長さから全長の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ遺伝子含んでいると推測されたのでc1及びc2の塩基配列の決定を行った結果、配列番号1に示される塩基配列が得られた。

実施例 6

ブタ脳 $\alpha-1, 6$ -フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現

実施例5で得られたブタ脳 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含むクローン体より $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ遺伝子のコード領域を発現ベクターpSVK3にサブクローニングした。該 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクターをCOS-1細胞に導入し、48時間培養後、培養細胞を集め、該細胞を破碎し、得られた破碎物の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ酵素活性を測定した。

コントロールとしてmock pSVK3を導入したCOS-1細胞の破碎物の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ酵素活性を測定した。コントロールではほとんど活性が検出されなかったのに対し、該 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクターを導入されたCOS-1細胞では2360nmol e/h/mg蛋白質と高い活性を示した。

実施例 7(1) ヒト胃癌細胞MKN 4 5 無血清培養液からの粗酵素液の調製

ヒト胃癌細胞MKN 4 5 を亜セレン酸ナトリウム及びカナマイシンを含むRPMI 1640 培地: Ham' s F-12 培地=1:1 の無血清培地にて、37℃、二酸化炭素濃度5%の条件で培養を行った。得られた無血清培養液100リットルを限外濾過により2リットルに濃縮し、5mM 2-メルカプトエタノールおよび0.1%CHAPS〔3-((3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ)-1-プロパンスルフォネート〕を含むトリス-塩酸緩衝液、pH7.5で緩衝液交換を行い、粗酵素液とした。さらに、この粗酵素液をQ-セファロース、GDPヘキサノールアミンセファロース、(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-アスパラギン-セファロース等のカラムクロマトグラフィーに供し、活性画分を集めて本発明のヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼを精製することができた。

(2) 酵素の調製

上記(1)によって得た粗酵素抽出液を以下の精製に用いた。5mM 2-メルカプトエタノール及び0.1%CHAPSを含むトリス-塩酸緩衝液、pH7.5で平衡化したQ-セファロースのカラムに供した。カラムをその5倍容量の同一の緩衝液で洗浄した後、0.1M NaClを含む同緩衝液で溶出してきた活性画分を集めた。活性画分を限外濾過膜にて濃縮し、5mM 2-メルカプトエタノール及び0.7%CHAPSを含むトリス-塩酸緩衝液、pH7.5で緩衝液交換を行った後、同緩衝液で平衡化したGDPヘキサノールアミン-セファロースのカラムに供した。溶出は0~0.5MまでのNaCl直線濃度勾配によって行った。

0.15~0.3Mの活性画分を集めて限外濾過膜で濃縮し、脱塩を行った後、5mM 2-メルカプトエタノールおよび0.7%CHAPSを含むトリス-塩酸緩衝液、pH7.5で平衡化した(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-アスパラギン-セファロースのカラムに供した。溶出は0~0.

5 MまでのNaCl直線濃度勾配によって行った。

0.2～0.5 Mの活性画分を集めて限外濾過膜で濃縮し、脱塩を行うことにより、ヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼを得ることができた。

得られたヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼ画分は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量60,000の位置に単一バンドを示し、他のトランスフェラーゼおよびグリコシダーゼなどの活性はなく、精製酵素標品は糖鎖研究用試薬として十分使用可能であった。

本発明の酵素の至適pH（緩衝液のpHを変化させて求めた結果）を図4に示す。該酵素はpH7.0～7.5付近に高い活性を示した。図中、黒丸はメス緩衝液を使用した場合、白丸はトリス-塩酸緩衝液を使用した場合を示す。

本発明の酵素のpH安定性についても、同様に検討した。図5は該酵素を各緩衝液中でそれぞれのpHにおいて、4℃、5時間処理した後の残存活性を示しているが、該酵素はpH4～10で比較的安定であり、特にpH5～9の間においてより良好な安定性を示した。図中、黒三角は酢酸緩衝液、黒丸はメス緩衝液、白丸はトリス-塩酸緩衝液および白三角は炭酸水素ナトリウム緩衝液を使用した場合を示す。

本発明の酵素の至適温度は、図6に示すように37℃付近に認められた。また、20～40℃の範囲で十分な作用を保持すると考えられた。また、凍結品は-20℃で少なくとも数ヶ月間は安定にその活性を保持した。

また、本発明の酵素は2価金属イオン非存在下でも十分な活性を示した。さらに、キレート剤であるEDTA 5 mMの存在下でも十分な活性を示したことから、2価金属イオンの要求性は示さないと結論した。

実施例 8

ヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼのアミノ酸配列の決定

1 μ gの精製したヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、エレクトロブロッティング法によってPVDF膜（ミリポア社製）タンパク質を転写した。該PVDF膜をクーマシーブルーリリアントブルーG250により染色し、約60 kDaの位置に単一の α 1-6フコシルトランスフェラーゼのバンドを検出した。次に該バンドを含むPVDF

膜を切り取り 50%メタノールで脱染色した後、バイオシステム 473A プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステム社製）に供し、ヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼのアミノ末端アミノ酸配列を決定した。決定されたアミノ酸配列は配列表の配列番号 11 に示す。

実施例 9

ヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの部分アミノ酸配列の決定

約 5 μ g の精製したヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをリジンエンドペプチダーゼと混合後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した後、エレクトロブロッティング法により PVDF 膜（ミリポア社製）にペプチド断片を転写した。該 PVDF 膜をクーマシーブリリアントブルー G250 により染色し 2 本のメインバンドを含む数本のペプチド断片を含むバンドを検出した。次にメインの 2 本の該バンドを含む PVDF 膜を切り取り 50%メタノールで脱染色した後、バイオシステム 473A プロテインシーケンサー（アプライドバイオシステム社製）に供し、ヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの内部アミノ酸配列を決定した。決定されたアミノ酸配列を配列表の配列番号 12 および 13 に示す。

実施例 10

PCR によるプローブ DNA の作成

実施例 9 で得られたアミノ酸配列をもとにして、配列表の配列番号 14 および 15 に示されるミックスプライマーを合成した。配列表の配列番号 14 で表されるミックスプライマーはセンスプライマーとして、配列表の配列番号 15 で表されるミックスプライマーはアンチセンスプライマーとして使用した。PCR 反応は 2 μ g ヒト由来 cDNA、25 pmol e センスプライマー（配列表の配列番号 14 で示されるミックスプライマー）、25 pmol e アンチセンスプライマー（配列表の配列番号 15 で示されるミックスプライマー）、及び 2.5 単位 Taq DNA ポリメラーゼを含む 50 mM 塩化カリウム - 10 mM トリス・塩酸緩衝液（pH 8.3） - 1.5 mM 塩化マグネシウム - 0.001%ゼラチン - 200 μ M dNTP 反応溶液 50 μ l 中、94°C（30 秒間）、46°C（30 秒間）、72°C（1 分 30 秒間）を 1 サイクルとして 36 サイクル行うこと

により行った。

PCR反応後の反応液10 μ lを、2.0%アガロースゲル電気泳動に供することにより、PCR反応産物であるDNA断片の確認を行った。その結果、アガロースゲル電気泳動において約200bpの大きさのDNA断片が確認された。

該DNA断片をプラスミドpT7BLUEt-Vector（ノバジェン社製）にサブクローニングし、塩基配列の確認を行った結果、配列表の配列番号12および13に記載のアミノ酸配列をコードしていることが明らかとなり、該DNA断片が α 1-6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の一部分であることが確認された。

実施例11

ヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子の単離

実施例10で得られたDNA断片を〔 α - 32 P〕dCTP（3000Ci/mmol、アマシャム社製）でラベルしたものをプローブとして用い、ヒト胃癌細胞MKN45由来 λ ZAPcDNAライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法により、ヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含有するクローン体の検索を行った。約200万個のブランクを検索した結果、8個の陽性クローン体c1～c8が得られた。該クローン体c1～c7は制限酵素制限酵素切断パターンおよびその長さから全長の α 1-6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子含んでいると推測されたので、c1及びc2の塩基配列の決定を行った結果、配列表の配列番号9に示される配列が得られた。

実施例12

ヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼの発現

実施例11で得られたヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含むクローン体よりヒト α 1-6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子のコード領域を発現ベクターpSVK3にサブクローニンした。該 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクターをCOS-1細胞に導入し、48時間培養後培養細胞を集め、該細胞を破碎し、得られた破碎物の α 1-6フコシルトランスフェラーゼ酵素活性を測定した。コントロールとして、mock pSVK3を導入したCOS-1細胞の破碎物の α 1-6フコシルトランスフェ

ラーゼ酵素活性を測定した。コントロールではほとんど活性が検出されなかったのに対し、該 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクターを導入されたCOS-1細胞では2130nmole/h/mg蛋白質と高い活性を示した。

産業上の利用可能性

本発明のブタ $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼは、公知のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼとは、理化学的性質が種々の点で大きく異なり、より生理学的条件に近い反応至適条件で作用を示す。

また、本発明のヒト由来 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼも、公知のヒト $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼとは、理化学的性質が種々の点で大きく異なり、より生理学的条件に近い反応至適条件で作用を示す。したがって、本発明により、糖鎖の修飾や合成などの糖鎖工学、また、本発明の酵素に特異的な抗体あるいは遺伝子を使用することにより、癌などの疾病の診断法の開発が可能となる。

配列番号： 1

配列の長さ : 1728

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の特徴

起源

生物名：ブタ

配列

ATG CGG CCA TGG ACT GGT TCG TGG CGT TGG ATT ATG CTC ATT CTT TTT 48

Met Arg Pro Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1 5 10 15

GCC TGG GGG ACC TTG CTA TTT TAC ATA GGT GGT CAC TTG GTA CGA GAT 96

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp

20 25 30

AAT GAC CAC TCT GAT CAC TCT AGC CGA GAA CTG TCC AAG ATT TTG GCA 144

Asn Asp His Ser Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

35 40 45

AAG CTG GAA CGC TTA AAA CAA CAA AAT GAA GAC TTG AGG AGA ATG GCT 192

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala

50 55 60

GAA TCT CTC CGA ATA CCA GAA GGC CCC ATT GAT CAG GGG CCA GCT TCA 240

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Pro Ala Ser

65 70 75 80

GGA AGA GTT CGT GCT TTA GAA GAG CAA TTT ATG AAG GCC AAA GAA CAG 288

Gly Arg Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln Phe Met Lys Ala Lys Glu Gln

85 90 95

ATT GAA AAT TAT AAG AAA CAA ACT AAA AAT GGT CCA GGG AAG GAT CAT 336
 Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Thr Lys Asn Gly Pro Gly Lys Asp His
 100 105 110
 GAA ATC CTA AGG AGG AGG ATT GAA AAT GCA GCT AAA GAG CTC TGG TTT 384
 Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe
 115 120 125
 TTT CTA CAA AGT GAG TTG AAG AAA TTA AAG AAT TTA GAA GGA AAT GAA 432
 Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Asn Leu Glu Gly Asn Glu
 130 135 140
 CTC CAA AGA CAT GCA GAT GAA TTT CTA TCA GAT TTG GGA CAT CAT GAA 480
 Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Phe Leu Ser Asp Leu Gly His His Glu
 145 150 155 160
 AGG TCT ATA ATG ACG GAT CTA TAC TAC CTC AGT CAA ACA GAT GGG GCA 528
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 GGT GAT TGG CGT GAA AAG GAG GCC AAA GAT CTG ACA GAG CTG GTC CAG 576
 Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 CGG AGA ATA ACA TAT CTT CAG AAT CCC AAG GAC TGC AGC AAA GCC AAG 624
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys
 195 200 205
 AAG CTA GTG TGT AAT ATC AAC AAA GGC TGT GGC TAT GGC TGT CAG CTC 672
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 CAT CAT GTA GTG TAC TGC TTT ATG ATT GCA TAT GGC ACC CAG CGA ACA 720
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 CTC GCC TTG GAA TCT CAC AAT TGG CGC TAC GCT ACT GGG GGA TGG GAA 768
 Leu Ala Leu Glu Ser His Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu

245 250 255
 ACT GTG TTT AGA CCT GTA AGT GAG ACG TGC ACA GAC AGA TCT GGC AGC 816
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ser
 260 265 270
 TCC ACT GGA CAT TGG TCA GGT GAA GTA AAG GAC AAA AAT GTT CAG GTG 864
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
 275 280 285
 GTT GAG CTC CCC ATT GTA GAC AGT GTT CAT CCT CGT CCT CCA TAT TTA 912
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Val His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 CCC CTG GCT GTC CCA GAA GAC CTT GCA GAT CGA CTT GTA CGA GTC CAT 960
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His
 305 310 315 320
 GGT GAT CCT GCA GTG TGG TGG GTA TCC CAG TTT GTC AAG TAC TTG ATT 1008
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 CGC CCA CAA CCC TGG CTG GAA AAG GAA ATA GAA GAG GCC ACC AAG AAG 1056
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350
 CTA GGC TTC AAA CAT CCA GTT ATT GGA GTC CAT GTT AGA CGC ACA GAC 1104
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 AAA GTG GGA GCG GAA GCA GCC TTC CAT CCC ATT GAG GAA TAC ACG GTG 1152
 Lys Val Gly Ala Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Thr Val
 370 375 380
 CAC GTT GAA GAA GAC TTT CAG CTT CTT GCT CGC AGA ATG CAA GTG GAT 1200
 His Val Glu Glu Asp Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400
 AAA AAA AGG GTG TAT TTG GCC ACA GAT GAC CCT GCT TTG TTA AAA GAG 1248

Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ala Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 GCA AAA ACA AAG TAC CCC AGT TAT GAA TTT ATT AGT GAT AAC TCT ATC 1296
 Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Ser Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 TCT TGG TCA GCT GGA CTA CAT AAT CGA TAT ACA GAA AAT TCA CTT CGG 1344
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 GGT GTG ATC CTG GAT ATA CAC TTT CTC TCC CAG GCA GAC TTC CTA GTG 1392
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 TGT ACT TTT TCA TCG CAG GTC TGT AGA GTT GCT TAT GAA ATC ATG CAA 1440
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 GCG CTG CAT CCT GAT GCC TCT GCG AAC TTC CGT TCT TTG GAT GAC ATC 1488
 Ala Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe Arg Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 TAC TAT TTT GGA GGC CCA AAT GCC CAC AAC CAA ATT GCC ATT TAT CCT 1536
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Pro Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Pro
 500 505 510
 CAC CAA CCT CGA ACT GAA GGA GAA ATC CCC ATG GAA CCT GGA GAT ATT 1584
 His Gln Pro Arg Thr Glu Gly Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 ATT GGT GTG GCT GGA AAT CAC TGG GAT GGC TAT CCT AAA GGT GTT AAC 1632
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Pro Lys Gly Val Asn
 530 535 540
 AGA AAA CTG GGA AGG ACG GGC CTA TAT CCC TCC TAC AAA GTT CGA GAG 1680
 Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560

AAG ATA GAA ACA GTC AAG TAC CCC ACA TAT CCC GAG GCT GAC AAG TAA 1728

Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Asp Lys

565

570

575

配列番号 : 2

配列の長さ : 575

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列

Met Arg Pro Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe

1

5

10

15

Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp

20

25

30

Asn Asp His Ser Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala

35

40

45

Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala

50

55

60

Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Pro Ala Ser

65

70

75

80

Gly Arg Val Arg Ala Leu Glu Glu Gln Phe Met Lys Ala Lys Glu Gln

85

90

95

Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Thr Lys Asn Gly Pro Gly Lys Asp His

100

105

110

Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe

115

120

125

Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Asn Leu Glu Gly Asn Glu

130

135

140

Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Phe Leu Ser Asp Leu Gly His His Glu

145	150	155	160
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala			
	165	170	175
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln			
	180	185	190
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys			
	195	200	205
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu			
	210	215	220
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr			
225	230	235	240
Leu Ala Leu Glu Ser His Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu			
	245	250	255
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ser			
	260	265	270
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val			
	275	280	285
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Val His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu			
	290	295	300
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His			
305	310	315	320
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile			
	325	330	335
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys			
	340	345	350
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp			
	355	360	365
Lys Val Gly Ala Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Thr Val			
	370	375	380

His Val Glu Glu Asp Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ala Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Ser Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 Ala Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe Arg Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Pro Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Pro
 500 505 510
 His Gln Pro Arg Thr Glu Gly Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Pro Lys Gly Val Asn
 530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Asp Lys
 565 570 575

配列番号 : 3

配列の長さ : 26

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Gln Thr Lys Asn Gly Pro Gly Lys Asp His Glu Ile Leu Arg Arg

5

10

15

Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Gln

20

25

配列番号：4

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Asp Lys

5

10

配列番号：5

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Tyr Leu Ile Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys

5

10

配列番号：6

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ala Leu Leu Lys

5

10

配列番号：7

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

AARSAR ACNAA RAAYG GNCC

19

配列番号：8

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TCNGG RTANG TNGGR TAYTT

20

配列番号：9

配列の長さ：2100

配列の型：核酸

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴

起源

生物名：ヒト

配列

```

                                AAGCTTC CTACACATAT   17
CACCAGGAGG ATCTCTTTGA AAGATTCACCT GCAGGACTAC CAGAGAGAAT AATTTGTCTG   77
AAGCATCATG TGTGAAACA ACAGAAGTCT ATTCACCTGT GCACTAACTA GAAACAGAGT  137
TACAATGTTT TCAATTCTTT GAGCTCCAGG ACTCCAGGGA AGTGAGTTGA AAATCTGAAA  197
ATG CGG CCA TGG ACT GGT TCC TGG CGT TGG ATT ATG CTC ATT CTT TTT   245
Met Arg Pro Trp Thr Gly Ser Trp Arg Trp Ile Met Leu Ile Leu Phe
           5              10              15
GCC TGG GGG ACC TTG CTG TTT TAT ATA GGT GGT CAC TTG GTA CGA GAT   293
Ala Trp Gly Thr Leu Leu Phe Tyr Ile Gly Gly His Leu Val Arg Asp
           20              25              30
AAT GAC CAT CCT GAT CAC TCT AGC CGA GAA CTG TCC AAG ATT CTG GCA   341
Asn Asp His Pro Asp His Ser Ser Arg Glu Leu Ser Lys Ile Leu Ala
           35              40              45
AAG CTT GAA CGC TTA AAA CAG CAG AAT GAA GAC TTG AGG CGA ATG GCC   389
Lys Leu Glu Arg Leu Lys Gln Gln Asn Glu Asp Leu Arg Arg Met Ala
           50              55              60
GAA TCT CTC CGG ATA CCA GAA GGC CCT ATT GAT CAG GGG CCA GCT ATA   437
Glu Ser Leu Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Pro Ala Ile
           65              70              75              80
GGA AGA GTA CGC GTT TTA GAA GAG CAG CTT GTT AAG GCC AAA GAA CAG   485
Gly Arg Val Arg Val Leu Glu Glu Gln Leu Val Lys Ala Lys Glu Gln
           85              90              95
ATT GAA AAT TAC AAG AAA CAG ACC AGA AAT GGT CTG GGG AAG GAT CAT   533
Ile Glu Asn Tyr Lys Lys Gln Thr Arg Asn Gly Leu Gly Lys Asp His
           100             105             110

```

GAA ATC CTG AGG AGG AGG ATT GAA AAT GGA GCT AAA GAG CTC TGG TTT	581
Glu Ile Leu Arg Arg Arg Ile Glu Asn Gly Ala Lys Glu Leu Trp Phe	
115 120 125	
TTC CTA CAG AGT GAA TTG AAG AAA TTA AAG AAC TTA GAA GGA AAT GAA	629
Phe Leu Gln Ser Glu Leu Lys Lys Leu Lys Asn Leu Glu Gly Asn Glu	
130 135 140	
CTC CAA AGA CAT GCA GAT GAA TTT CTT TTG GAT TTA GGA CAT CAT GAA	677
Leu Gln Arg His Ala Asp Glu Phe Leu Leu Asp Leu Gly His His Glu	
145 150 155 160	
AGG TCT ATA ATG ACG GAT CTA TAC TAC CTC AGT CAG ACA GAT GGA GCA	725
Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala	
165 170 175	
GGT GAT TGG CGG GAA AAA GAG GCC AAA GAT CTG ACA GAA CTG GTT CAG	773
Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln	
180 185 190	
CGG AGA ATA ACA TAT CTT CAG AAT CCC AAG GAC TGC AGC AAA GCC AAA	821
Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys	
195 200 205	
AAG CTG GTG TGT AAT ATC AAC AAA GGC TGT GGC TAT GGC TGT CAG CTC	869
Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu	
210 215 220	
CAT CAT GTG GTC TAC TGC TTC ATG ATT GCA TAT GGC ACC CAG CGA ACA	917
His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr	
225 230 235 240	
CTC ATC TTG GAA TCT CAG AAT TGG CGC TAT GCT ACT GGT GGA TGG GAG	965
Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu	
245 250 255	
ACT GTA TTT AGG CCT GTA AGT GAG ACA TGC ACA GAC AGA TCT GGC ATC	1013
Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ile	

260	265	270	
TCC ACT GGA CAC TGG TCA GGT GAA GTG AAG GAC AAA AAT GTT CAA GTG	1061		
Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val			
275	280	285	
GTC GAG CTT CCC ATT GTA GAC AGT CTT CAT CCC CGT CCT CCA TAT TTA	1109		
Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu			
290	295	300	
CCC TTG GCT GTA CCA GAA GAC CTC GCA GAT CGA CTT GTA CGA GTG CAT	1157		
Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His			
305	310	315	320
GGT GAC CCT GCA GTG TGG TGG GTG TCT CAG TTT GTC AAA TAC TTG ATC	1205		
Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile			
325	330	335	
CGC CCA CAG CCT TGG CTA GAA AAA GAA ATA GAA GAA GCC ACC AAG AAG	1253		
Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys			
340	345	350	
CTT GGC TTC AAA CAT CCA GTT ATT GGA GTC CAT GTC AGA CGC ACA GAC	1301		
Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp			
355	360	365	
AAA GTG GGA ACA GAA GCT GCC TTC CAT CCC ATT GAA GAG TAC ATG GTG	1349		
Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val			
370	375	380	
CAT GTT GAA GAA CAT TTT CAG CTT CTT GCA CGC AGA ATG CAA GTG GAC	1397		
His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp			
385	390	395	400
AAA AAA AGA GTG TAT TTG GCC ACA GAT GAC CCT TCT TTA TTA AAG GAG	1445		
Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu			
405	410	415	
GCA AAA ACA AAG TAC CCC AAT TAT GAA TTT ATT AGT GAT AAC TCT ATT	1493		

Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 TCC TGG TCA GCT GGA CTG CAC AAT CGA TAC ACA GAA AAT TCA CTT CGT 1541
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 GGA GTG ATC CTG GAT ATA CAT TTT CTC TCT CAG GCA GAC TTC CTA GTG 1589
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 TGT ACT TTT TCA TCC CAG GTC TGT CGA GTT GCT TAT GAA ATT ATG CAA 1637
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 ACA CTA CAT CCT GAT GCC TCT GCA AAC TTC CAT TCT TTA GAT GAC ATC 1685
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 TAC TAT TTT GGG GGC CAG AAT GCC CAC AAT CAA ATT GCC ATT TAT GCT 1733
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Ala
 500 505 510
 CAC CAA CCC CGA ACT GCA GAT GAA ATT CCC ATG GAA CCT GGA GAT ATC 1781
 His Gln Pro Arg Thr Ala Asp Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 ATT GGT GTG GCT GGA AAT CAT TGG GAT GGC TAT TCT AAA GGT GTC AAC 1829
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540
 AGG AAA TTG GGA AGG ACG GGC CTA TAT CCC TCC TAC AAA GTT CGA GAG 1877
 Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 AAG ATA GAA ACG GTC AAG TAC CCC ACA TAT CCT GAG GCT GAG AAA TAA 1925
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys ---
 565 570 575

AGCTCAGATG GAAGAGATAA ACGACCAAAC TCAGTTCGAC CAAACTCAGT TCAAACCATT 1985
 TCAGCCAAAC TGTAGATGAA GAGGGCTCTG ATCTAACAAA ATAAGGTTAT ATGAGTAGAT 2045
 ACTCTCAGCA CCAAGAGCAG CTGGGAACTG ACATAGGCTT CAATTGGTGG AATTC 2100

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 575

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖

配列の種類 : タンパク質

配列

Met	Arg	Pro	Trp	Thr	Gly	Ser	Trp	Arg	Trp	Ile	Met	Leu	Ile	Leu	Phe
1				5						10					15
Ala	Trp	Gly	Thr	Leu	Leu	Phe	Tyr	Ile	Gly	Gly	His	Leu	Val	Arg	Asp
				20						25					30
Asn	Asp	His	Pro	Asp	His	Ser	Ser	Arg	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Leu	Ala
				35						40					45
Lys	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Glu	Asp	Leu	Arg	Arg	Met	Ala
				50											60
Glu	Ser	Leu	Arg	Ile	Pro	Glu	Gly	Pro	Ile	Asp	Gln	Gly	Pro	Ala	Ile
				65											70
Gly	Arg	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Val	Lys	Ala	Lys	Glu	Gln
															85
Ile	Glu	Asn	Tyr	Lys	Lys	Gln	Thr	Arg	Asn	Gly	Leu	Gly	Lys	Asp	His
															100
Glu	Ile	Leu	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Asn	Gly	Ala	Lys	Glu	Leu	Trp	Phe
															110
Phe	Leu	Gln	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Lys	Asn	Leu	Glu	Gly	Asn	Glu
															120
Leu	Gln	Arg	His	Ala	Asp	Glu	Phe	Leu	Leu	Asp	Leu	Gly	His	His	Glu
															130
															140

145 150 155 160
 Arg Ser Ile Met Thr Asp Leu Tyr Tyr Leu Ser Gln Thr Asp Gly Ala
 165 170 175
 Gly Asp Trp Arg Glu Lys Glu Ala Lys Asp Leu Thr Glu Leu Val Gln
 180 185 190
 Arg Arg Ile Thr Tyr Leu Gln Asn Pro Lys Asp Cys Ser Lys Ala Lys
 195 200 205
 Lys Leu Val Cys Asn Ile Asn Lys Gly Cys Gly Tyr Gly Cys Gln Leu
 210 215 220
 His His Val Val Tyr Cys Phe Met Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Thr
 225 230 235 240
 Leu Ile Leu Glu Ser Gln Asn Trp Arg Tyr Ala Thr Gly Gly Trp Glu
 245 250 255
 Thr Val Phe Arg Pro Val Ser Glu Thr Cys Thr Asp Arg Ser Gly Ile
 260 265 270
 Ser Thr Gly His Trp Ser Gly Glu Val Lys Asp Lys Asn Val Gln Val
 275 280 285
 Val Glu Leu Pro Ile Val Asp Ser Leu His Pro Arg Pro Pro Tyr Leu
 290 295 300
 Pro Leu Ala Val Pro Glu Asp Leu Ala Asp Arg Leu Val Arg Val His
 305 310 315 320
 Gly Asp Pro Ala Val Trp Trp Val Ser Gln Phe Val Lys Tyr Leu Ile
 325 330 335
 Arg Pro Gln Pro Trp Leu Glu Lys Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Lys
 340 345 350
 Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr Asp
 355 360 365
 Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe His Pro Ile Glu Glu Tyr Met Val
 370 375 380

His Val Glu Glu His Phe Gln Leu Leu Ala Arg Arg Met Gln Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Lys Arg Val Tyr Leu Ala Thr Asp Asp Pro Ser Leu Leu Lys Glu
 405 410 415
 Ala Lys Thr Lys Tyr Pro Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser Ile
 420 425 430
 Ser Trp Ser Ala Gly Leu His Asn Arg Tyr Thr Glu Asn Ser Leu Arg
 435 440 445
 Gly Val Ile Leu Asp Ile His Phe Leu Ser Gln Ala Asp Phe Leu Val
 450 455 460
 Cys Thr Phe Ser Ser Gln Val Cys Arg Val Ala Tyr Glu Ile Met Gln
 465 470 475 480
 Thr Leu His Pro Asp Ala Ser Ala Asn Phe His Ser Leu Asp Asp Ile
 485 490 495
 Tyr Tyr Phe Gly Gly Gln Asn Ala His Asn Gln Ile Ala Ile Tyr Ala
 500 505 510
 His Gln Pro Arg Thr Ala Asp Glu Ile Pro Met Glu Pro Gly Asp Ile
 515 520 525
 Ile Gly Val Ala Gly Asn His Trp Asp Gly Tyr Ser Lys Gly Val Asn
 530 535 540
 Arg Lys Leu Gly Arg Thr Gly Leu Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Arg Glu
 545 550 555 560
 Lys Ile Glu Thr Val Lys Tyr Pro Thr Tyr Pro Glu Ala Glu Lys ---
 565 570 575

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Arg Ile Pro Glu Gly Pro Ile Asp Gln Gly Pro Ala Ile Gly

5

10

配列番号：1 2

配列の長さ：25

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Lys Leu Gly Phe Lys His Pro Val Ile Gly Val His Val Arg Arg Thr

5

10

15

Asp Lys Val Gly Thr Glu Ala Ala Phe

20

25

配列番号：1 3

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Thr Lys Tyr Pro Asn Tyr Glu Phe Ile Ser Asp Asn Ser

5

10

配列番号：1 4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

TTYAA RCAYC CHGTB ATYGG 20

配列番号：1 5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：DNA

配列

GWRTT RTCRG WRATR AAYTC 20

請求の範囲

1. 下記理化学的性質を有するブタ由来 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ。

(1) 作用：

(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-R
(式中、Rはアスパラギン残基または該残基を有するペプチド鎖を示す)
を受容体として、グアノシンジホスフェート-フコースから、受容体の最もRに近いGlcNAcの6位の水酸基にフコースを転移し、(GlcNAc β 1-2Man α 1-6)(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4(Fuc α 1-6)GlcNAc-Rを生成する。

(2) 至適pH：約7.0

(3) pH安定性：4℃、5時間の処理で、pH4.0～10.0の範囲で安定である。

(4) 至適温度：約30～37℃

(5) 阻害または活性化：活性の発現に、2価金属を要求せず、また、5mMEDTA存在下においても活性は阻害されない。

(6) 分子量：約60,000 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

2. ブタの脳から精製された請求項1記載のブタ由来 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ。

3. ブタ由来の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

4. 配列表・配列番号2に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項3記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

5. 配列表・配列番号1に示される塩基配列を含む請求項3記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

6. 配列表・配列番号2に示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸が、置換、挿入、削除、又は付加されているアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項3記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

7. 配列表・配列番号1に示される塩基配列の少なくとも1つが置換、挿入、削

除、又は付加されている塩基配列を含む請求項 3 記載の $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

8. 配列表・配列番号 1 に示される塩基配列を含む $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の少なくとも一部にハイブリダイズする遺伝子。

9. 請求項 3～8 のいずれか 1 項に記載される $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクター。

10. 請求項 9 に記載の発現ベクターにより宿主細胞を形質転換した形質転換細胞。

11. 請求項 10 に記載の形質転換細胞を培養し、該培養物から $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの製造方法。

12. 請求項 11 に記載の組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼの製造方法により製造された組換え $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ。

13. 下記理化学的性質を有するヒト由来 $\alpha 1-6$ フコシルトランスフェラーゼ。

(1) 作用：

(GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-6$) (GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-3$) Man $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-4$ GlucNAc-R
(式中、R はアスパラギン残基または該残基を有するペプチド鎖を示す)
を受容体として、グアノシンジホスフェート-フコースから、受容体の最も R に近い GlucNAc の 6 位の水酸基にフコースを転移し、(GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-6$) (GlcNAc $\beta 1-2$ Man $\alpha 1-3$) Man $\beta 1-4$ GlcNAc $\beta 1-4$ (Fuc $\alpha 1-6$) GlucNAc-R を生成する。

(2) 至適 pH：約 7.5

(3) pH 安定性：4℃、5 時間の処理で、pH 4.0～10.0 の範囲で安定である。

(4) 至適温度：約 30～37℃

(5) 阻害または活性化：活性の発現に、2 価金属を要求せず、また、5 mM

EDTA存在下においても活性は阻害されない。

(6) 分子量：約60,000 (SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

14. ヒト細胞培養液から精製された請求項13記載のヒト由来 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ。

15. ヒト細胞培養液がヒト胃癌細胞無血清培養液である請求項14記載のヒト由来 α 1-6フコシルトランスフェラーゼ。

16. ヒト由来 α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

17. 配列表・配列番号10に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項16記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

18. 配列表・配列番号9に示される塩基配列を含む請求項16記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

19. 配列表・配列番号9に示される198番目のアデニンから1919番目のグアニンまでに示される塩基配列を含む請求項16記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

20. 配列表・配列番号10に示されるアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸が、置換、挿入、削除、又は付加されているアミノ酸配列をコードする遺伝子を含む請求項16記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

21. 配列表・配列番号9に示される塩基配列の少なくとも1つが置換、挿入、削除、又は付加されている塩基配列を含む請求項16記載の α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子。

22. 配列表・配列番号9に示される塩基配列を含む α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の少なくとも一部にハイブリダイズする遺伝子。

23. 請求項16～22のいずれか1項に記載される α 1-6フコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなる発現ベクター。

24. 請求項23に記載の発現ベクターにより宿主細胞を形質転換した形質転換細胞。

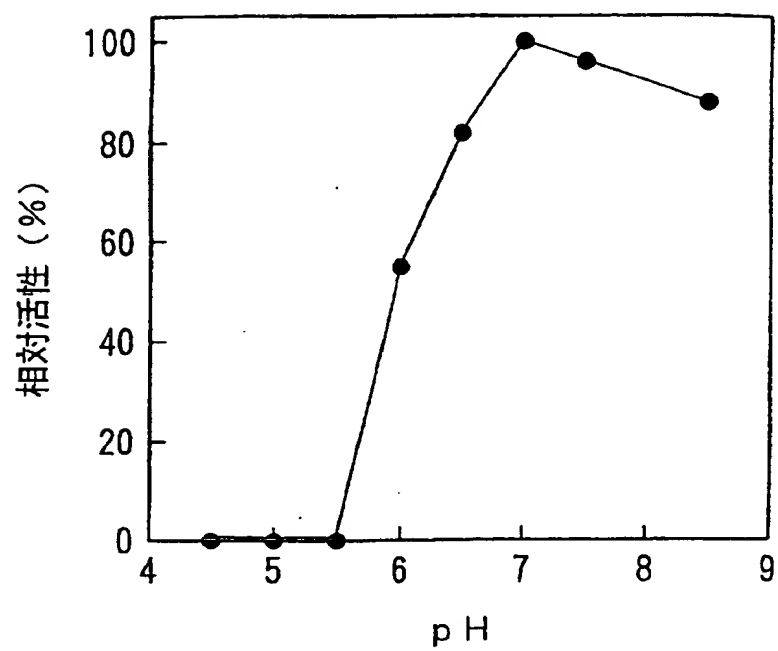
25. 請求項24に記載の形質転換細胞を培養し、該培養物から α 1-6フコシルトランスフェラーゼを採取することを特徴とする組換え α 1-6フコシルトラ

ンスフェラーゼの製造方法。

26. 請求項25に記載の組換え α 1-6フコシルトランスフェラーゼの製造方法により製造された組換え α 1-6フコシルトランスフェラーゼ。

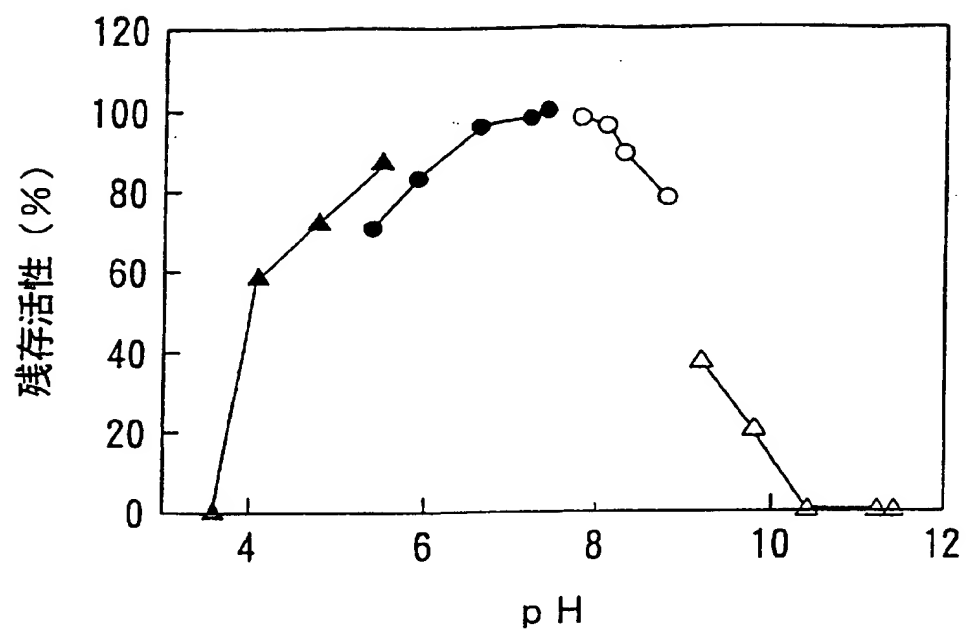
第1図

至適pH



第2図

pH安定性



酢酸緩衝液

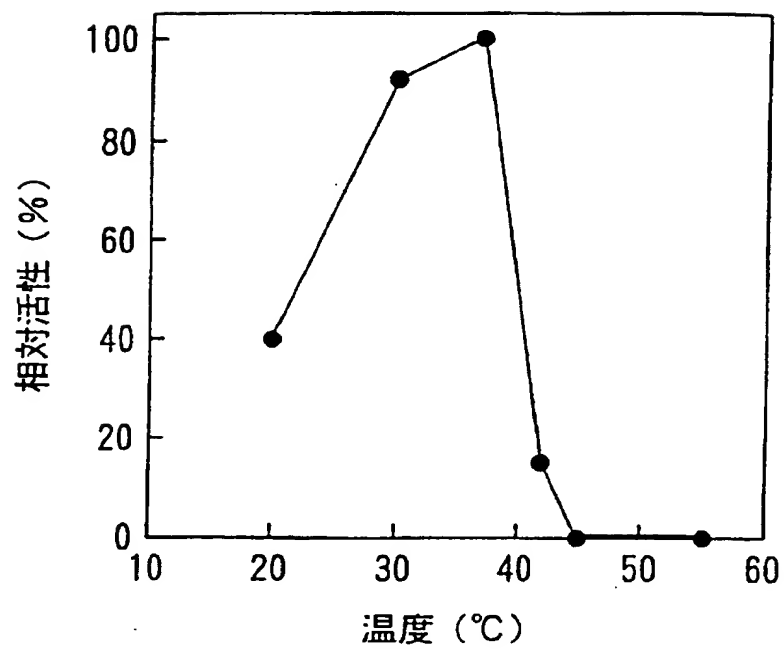
メス緩衝液

トリス-塩酸緩衝液

炭酸水素ナトリウム緩衝液

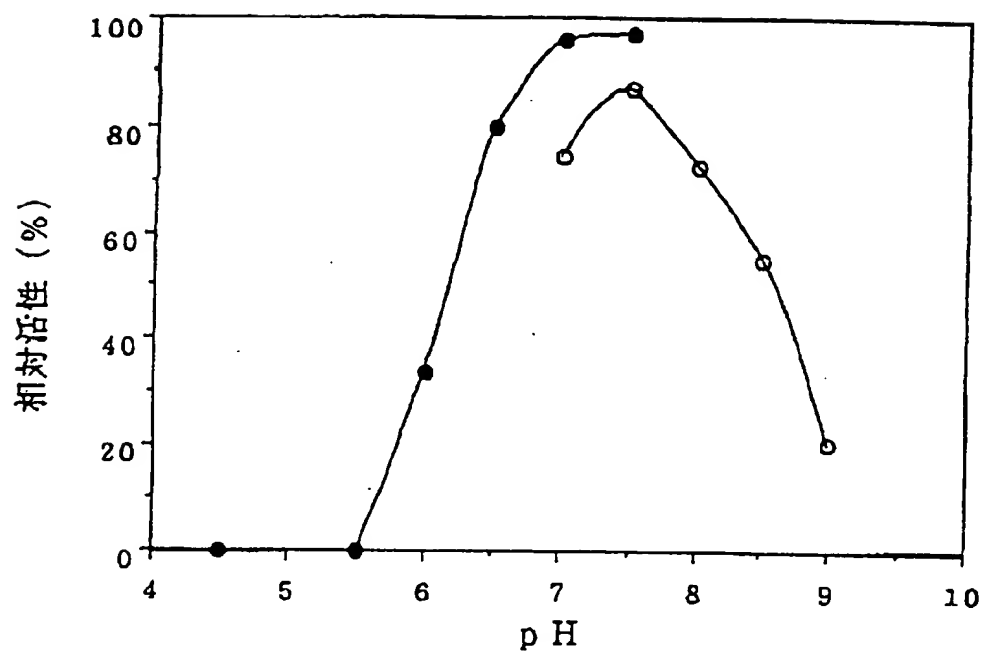
第3図

至適温度



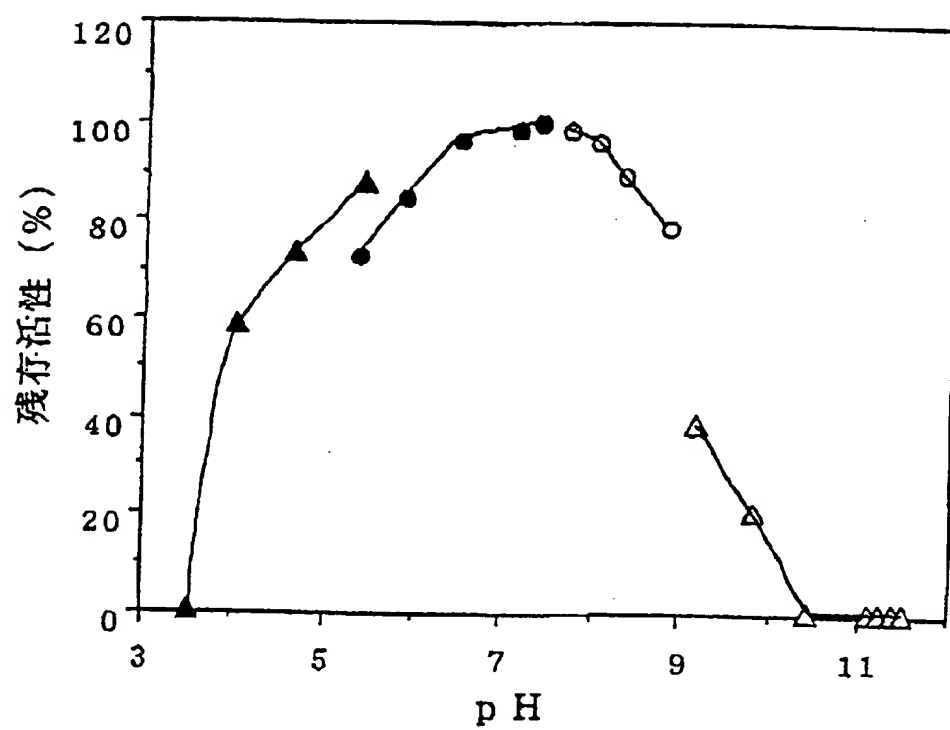
第4図

至適 pH



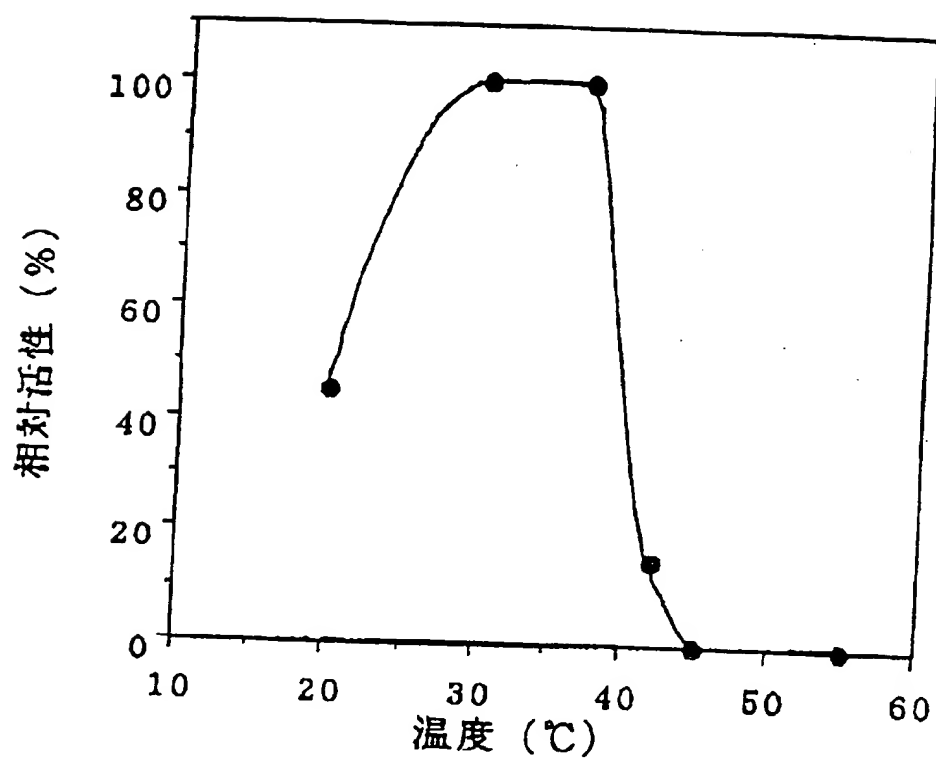
第5図

pH 安定性



第6図

至適温度



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/54, C12N9/10, C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/54, C12N9/10, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS, WPI/WPI,L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX/PY	J. Biol. Chem. 271(44) 1996 Uozumi N. et al. "Purification and cDNA cloning of porcine brain" p. 27810-27817	1-12/13-26
PY	J. Biochem. 120(2) 1996 Uozume N. et al. "A fluorescent assay method for GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha-1-6fucosyltransferase activity, involving high performance liquid chromatography" p. 385-392	1 - 26
A	J. Biol. Chem. 266(32) 1991 VOYNOW J. A. et al. "Purification and characterization of GDP-L-fucose-N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha-1-6 fucosyltransferase from cultured human skin fibroblasts requirement of a specific biantennary oligosaccharide as substrate" p. 21572-21577	1 - 26

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

April 21, 1997 (21. 04. 97)

Date of mailing of the international search report

April 30, 1997 (30. 04. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP97/00171

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Intcl^o C12N15/54, C12N9/10, C12N5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Intcl^o C12N15/54, C12N9/10, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ON LINE, BIOSIS, WPI/WPI, L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX/PY	J. Biol. Chem. 271(44) 1996 Uozumi N. et al. 「Purification and cDNA cloning of porcine brain」 p. 27810-27817	1-12/13-26
PY	J. Biochem. 120(2) 1996 Uozumi N. et al. 「A fluorescent assay method for GDP-L-Fuc:N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha-1-6 fucosyltransferase activity, involving high performance liquid chromatography」 p. 385-392	1-26
A	J. Biol. Chem. 266(32) 1991 VOYNOW J A et al. 「Purification and characterization of GDP-L-fucose-N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha-1-6 fucosyltransferase from cultured human skin fibroblasts requirement of a specific biantennary oligosaccharide as substrate」 p. 21572-21577	1-26

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
21.04.97国際調査報告の発送日
30.04.97国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
田中 美奈子

4 B 9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.